(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-538948
(P2005-538948A)
(43)公表日　平成17年12月22日(2005.12.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C07K 14/29	C07K	14/29	ZNA	4B024
A61K 39/00	A61K	39/00	Z	4C085
A61K 39/02	A61K	39/02		4H045
A61K 39/395	A61K	39/395	N	
A61P 31/04	A61P	31/04		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 23 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-504973 (P2004-504973)
(86)(22)出願日　平成15年5月15日 (2003.5.15)
(85)翻訳文提出日　平成17年1月11日 (2005.1.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/015072
(87)国際公開番号　WO2003/096974
(87)国際公開日　平成15年11月27日 (2003.11.27)
(31)優先権主張番号　60/380,301
(32)優先日　平成14年5月15日 (2002.5.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504238563
ザ　ユナイテッド　ステイツ　オブ　アメリカ　アズ　レプレゼンティッド　バイ　ザ　セクレタリー　オブ　ザ　ネイビー
アメリカ合衆国　バージニア州　２２２１７　アーリントン　ノーズ　クインシー　ストリート　８００
(74)代理人　100083806
弁理士　三好　秀和
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(72)発明者　チン、　ウェイ　メイ
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８１７　ベゼスダ　ウィッティアー　ブールバード　８０１４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ツツガムシ病およびＨＩＶ感染に対するオリエンチア・ツツガムシトランケートされた組換え体の外膜タンパク質（ｒ４７）および（ｒ５６）ワクチンの診断学及び治療学

(57)【要約】
トランケートされたｒ４７タンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質を含むツツガムシ病ワクチンを開示する。ｒ５６タンパク質の変異体を含むワクチンも開示する。ｒ４７およびｒ５６タンパク質を用いたＨＩＶウィルス負荷の軽減方法およびｒ４７およびｒ５６に対して作成された抗体も開示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｒ４７トランケートされたタンパク質；
ｒ５６トランケートされたタンパク質；および
薬学的に許容される担体、
を含むツツガムシ病免疫原性の組成物。
【請求項２】
前記ｒ４７トランケートされたタンパク質が配列番号１である請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択される請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択されるいずれか２個のタンパク質である請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４を含む請求項１に記載のワクチン。
【請求項６】
トランケートされたｒ４７タンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量を投与することを包含する、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法。
【請求項７】
前記用量が皮下投与される請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ｒ４７トランケートされたタンパク質が配列番号１である請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択される請求項６に記載の方法。
【請求項１０】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択されるいずれか２個である請求項６に記載の方法。
【請求項１１】
前記ｒ５６トランケートされたタンパク質が配列番号２～４を含む請求項６に記載の方法。
【請求項１２】
下記工程、
ａ．対象から試料を得ること、
前記試料をトランケートされたｒ４７タンパク質とトランケートされたｒ５６タンパク質との組み合わせ、または、ＥＬＩＳＡプレート、ドットブロットマトリックス、およびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される分析機器において前記組み合わせに対する実験室で生成された抗体に曝露すること、
ｂ．前記試料中の前記タンパク質の組み合わせに対する抗体を検出すること、または、
前記分析機器において前記試料中の前記実験室抗体に対する抗原を検出すること、
を含むツツガムシ病を検出するための分析方法。
【請求項１３】
前記試料が血液、尿または口腔液を含む請求項１２に記載の分析方法。
【請求項１４】
配列番号２～４よりなる群から選択されるトランケートされたｒ４７タンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質およびその組み合わせに対して作られた抗体、およ

び薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ患者を治療するための医薬組成物であって、前記組成物の投与が前記患者のＨＩＶウィルス負荷を軽減する上記組成物。
【請求項１５】
前記トランケートされたｒ４７タンパク質が配列番号１である請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
配列番号２～４よりなる群から選択されるトランケートされたｒ４７タンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質およびその組み合わせの薬学的有効用量、および薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ感染に対抗する免疫原性組成物。
【請求項１７】
前記トランケートされたｒ４７タンパク質が配列番号１である請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
トランケートされたｒ５６タンパク質および薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ患者を治療するための医薬組成物であって、前記組成物の投与が前記患者のウィルス負荷を軽減する上記組成物。
【請求項１９】
前記ｒ５６タンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択される請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
前記ｒ５６タンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択されるいずれか２個である請求項１８に記載の組成物。
【請求項２１】
配列番号２～４を含む請求項１８に記載の組成物。
【請求項２２】
トランケートされたｒ４７タンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質の薬学的有効用量、および薬学的に許容される担体を投与することを含むＨＩＶ患者の治療方法であって、前記タンパク質の投与が前記患者のウィルス負荷を軽減する上記方法。
【請求項２３】
前記トランケートされたｒ５６タンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択される請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記トランケートされたｒ５６タンパク質が配列番号２～４よりなる群から選択されるいずれか２個である請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記トランケートされたｒ５６タンパク質が配列番号２～４を含む請求項２２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
技術の分野
本発明は、診断用抗原並びに免疫化剤として有用なオリエンチア・ツツガムシの４７ｋＤＡおよび５６ｋＤＡの表面タンパク質抗原に関する。さらに本発明は、患者におけるＨＩＶウィルス負荷を軽減するための治療方法に関する。
先行技術の記述
ツツガムシ感染は、偏性細胞内グラム陰性細菌Ｏ．ツツガムシによりひき起こされる。それはツガムシ病が地域特有であるアジア太平洋地域において全熱性発作の２３％までを占めており、未処置のまま放置すると３分の１までが死に至る。症状には肺炎、髄膜炎、発疹および頭痛が含まれる。レプトスピラ症、発疹熱、マラリアなどの他の急性発熱性疾病からツツガムシ病を識別することは、兆候および症状の類似性のために困難である。ツ

ツガムシ病患者の９５～９９％の血清は、全リケッチア性細胞のタンパク質含量の１０～１５％を含むＯ．ツツガムシの５６－ｋＤａのタンパク質を認識する。この５６－ｋＤａのタンパク質は、種々の菌株の間で保存された配列および独特の配列の両方を有し、早期の診断および潜在的なワクチン候補として開発され、使用されている。

【０００２】

全生物ワクチンは、以前より開発されており、それらの防護は短命であり、交差菌株の防護が欠けている。抗原性変異の原因となる変異性の５６ｋＤａのタンパク質である主要な表面タンパク質抗原は、相同性菌株に対して防護的な免疫性を誘発し、非相同性菌株に対しては誘発しないことが証明されている。１１０、４７および２２ｋＤａのような他の抗原は、又、高い血清反応性に関係しているという事実は、これらの抗原の数種の組み合わせが、Ｏ．ツツガムシ感染の種々の菌株に対して良好な防護を与えると示唆する。近年、ＨＩＶ感染患者にツツガムシ病感染患者の血漿を注入したところ、初回注入の２ヵ月後にはＨＩＶウィルス負荷が減少し、ツツガムシ病患者の血漿の薬学的作用が示唆されることが証明されている。

【０００３】

発明の概要

本報告書においては、我々は４７－ｋＤａのタンパク質遺伝子、ＮＣＢＩ受託番号Ｌ３１９３４．１のクローニング、および、より広範な防護特性を与えるワクチンの候補として、ｒ５６タンパク質と組み合わせて使用するための十分な量でかつ高純粋な組換え体４７－ｋＤａのタンパク質の生産を目標とした研究における、純粋なｒ４７を得るための試みを説明する。更に、この外膜タンパク質の配列検索により、セリンプロテアーゼとの類似性が示され、ｒ４７タンパク質そのものがプロテアーゼとして機能する可能性があることが示唆された。

【０００４】

ウエスタンブロットの結果によれば、ツツガムシ病患者からの血漿はｒ４７タンパク質に対し強力な抗原性の応答を示し、ＨＩＶ感染に対してｒ４７の潜在的な防護的役割が示唆された。この抑制効果はｒ４７タンパク質に対する抗体応答によるものであった可能性がある。あるいは、潜在的なプロテアーゼ活性を示しているセリンプロテアーゼとｒ４７タンパク質との間の相同性は、ＨＩＶのプロセシングへの干渉に帰するｒ４７に関連していた。

【０００５】

要約すると、ＮＣＢＩのタンパク質データベースの検索を行ったところ、Ｏ．ツツガムシＫａｒｐ菌株の４７ｋＤａの抗原（受託番号ｇｉ／１２２０５０１）４７ｋＤａおよびＨＩＶエンベロープタンパク質（受託番号ｇｉ／２２５０９７４）ＨＩＶｇｐ１２０との間には、１０－アミノ酸マッチ（８同一および２保存）に適合することが分かった。

【０００６】

パターン：ＴＬＲ＋ＩＶＴＮ＋Ｋ

従って、本発明の要件は、配列番号１のｒ４７トランケートされたタンパク質、配列番号２、配列番号３および配列番号４よりなる群から選択されるｒ５６トランケートされたタンパク質および薬学的に許容される担体を含むツツガムシ病免疫原性の組成物に指向する。

【０００７】

本発明の要件は、さらにまた、配列番号１のトランケートされたｒ４７タンパク質および配列番号２、配列番号３および配列番号４よりなる群から選択されるトランケートされたｒ５６タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量および薬学的に許容される担体を投与することを含む、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法に指向する。あるいは、前記方法はトランケートされたｒ４７またはトランケートされたｒ５６タンパク質のいずれかに対して作られた抗体の投与を含む。

【０００８】

本発明の要件はまた、ツツガムシ病のワクチンの薬学的有効量を投与することを含む、

ツツガムシ病に対して対象を免疫化するための方法を意図する。

【０００９】

本発明の要件はまた、対象から試料を得ること、ＥＬＩＳＡプレート、ドットブロットマトリックスおよびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される分析装置において、ｒ５６試験の補体としてのｒ４７タンパク質に試料を曝露することを含む、ツツガムシ病に対する抗体を検出するための分析を意図する。

【００１０】

本発明の要件はまた、配列番号１のトランケートされたｒ４７タンパク質および薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ患者の治療を意図しており、これはＨＩＶ患者のＨＩＶウィルス負荷を結果として軽減する。

【００１１】

本発明の要件はまた、配列番号２、配列番号３および配列番号４の群から選択されるｒ５６タンパク質を含むＨＩＶ患者の治療を意図する。

【００１２】

本発明の要件はさらに、潜在的なＨＩＶワクチンおよびトランケートされたｒ４７またはｒ５６タンパク質またはこれらのタンパク質の組み合わせを含むＨＩＶワクチンを意図する。

【００１３】

上記した特徴および他の特徴および利点は、実施例および図面を参照にしながら以下に記載する詳細な説明を検討することにより明らかになる。詳細な説明および実施例は例示であって限定的なものではなく、本発明の範囲は添付する請求項およびその等価物により定義される。

【００１４】

好ましい形態の詳細な記述

ツツガムシ病は、オリエンチア　ツツガムシによる感染によってひき起こされる急性の発熱性疾患である。Ｏ．ツツガムシはグラム陰性細菌であるが、リポ多糖類もペプチドグリカン層も有さない。オリエンチアの単離株はその抗原性の特性に関して非常に変異性である。Ｏ．ツツガムシの主要な表面タンパク質は変異性の５６－ｋＤＡのタンパク質である。オリエンチアの血清型－特異的モノクローナル抗体は、５６－ｋＤＡのタンパク質と反応する。大部分のツツガムシ病患者の血清は、このタンパク質を認識するが、他の４７－ｋＤＡタンパク質もまた認識され、５６－ｋＤＡおよび４７－ｋＤＡのタンパク質の両方が診断用抗原として使用するための良好な候補であり、そして、これら２種のタンパク質の組み合わせは、免疫原性の組成物としての潜在的用途を有することが示唆される。

【００１５】

本発明によれば、配列番号１のｒ４７トランケートされたタンパク質、ｒ５６トランケートされたタンパク質、および薬学的に許容される担体を含むツツガムシ病免疫原性の組成物が、一般的に提供される。

【００１６】

４７ｋＤａの抗原は膜タンパク質である。水溶液中に正しく折りたたまれたｒ４７タンパク質を生産するために、疎水性ドメインを含むそのＮ末端をトランケートした。フォワードプライマー配列番号５およびリバースプライマー配列番号６を設計して、ヌクレオチド１７４～１４８１、配列番号７の遺伝子セグメントを増幅した。増幅された遺伝子セグメントをｐＥＴ２４ａベクターにクローニングした。発現したタンパク質の配列は配列番号１である。

【００１７】

本発明の要件の実施形態において、ツツガムシ病免疫原性の組成物は、以下のｒ５６トランケートされたタンパク質、即ち、配列番号２、配列番号３または配列番号４の１つと組み合わせたｒ４７トランケートされたタンパク質および薬学的に許容される担体を含んでよい。

【００１８】
用量および投与
免疫原性の組成物の最適の用量は、ヒトに対しては０．５～２０ｍｇ、霊長類に対しては０．５～２．５ｍｇが意図される。免疫原性の組成物の投与は皮下で行う。
【００１９】
本発明の要件はまた、対象から試料を得ること、分析機器において前記試料を配列番号１で示されるトランケートされたｒ４７タンパク質に曝露することを含む、ツツガムシ病に対する抗体を検出するための分析を提供する。このような分析機器は、ＥＬＩＳＡプレート、ドットブロットマトリックスおよびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される。このような分析法に適する試料は、それから抗体が検出でき、実験室生成された抗体を用いてそれから抗原が検出できる、血液、口腔液および尿を包含する。
【００２０】
本発明の要件は更に、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法を含み、その方法は、配列番号１のトランケートされたタンパク質および配列番号２、配列番号３および配列番号４よりなる群から選択されるトランケートされたｒ５６タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量、および、薬学的に許容される担体を投与することを包含する。
【００２１】
本発明の要件はまた、トランケートされたｒ５６タンパク質に対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ患者の治療のための医薬組成物を意図しており、ここで、前記組成物の投与により患者のウィルス負荷が軽減する。そのようなトランケートされたタンパク質は、配列番号２～４よりなる群から選択されるか、これらの組み合わせである。用量および投与は、免疫原性の組成物に関して上記したものと同様である。
【００２２】
本発明の要件はさらに、ＨＩＶ患者におけるＨＩＶウィルス負荷の軽減をもたらす、配列番号１の群から選択されるトランケートされたｒ４７タンパク質に対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含むＨＩＶ患者の治療を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。
【００２３】
本発明の要件はまた、患者のＨＩＶウィルス負荷を軽減するために、ｒ４７トランケートされたタンパク質およびトランケートされたｒ５６タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を投与することを含む、ＨＩＶ患者の治療を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。
【００２４】
本発明の要件はまた、トランケートされたｒ４７タンパク質および配列番号２～４のトランケートされたｒ５６タンパク質およびその組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量を含むＨＩＶ感染に対する免疫原性の組成物を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。
【００２５】
以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を説明するためのものであり、本発明をこれらに限定ものとして解釈されるものではない。
【実施例】
【００２６】
実施例１
４７－ｋＤａ（受託番号Ｌ３１９３４．１）に特異的なフォワードおよびリバースＤＮＡプライマー（それぞれ配列番号５－６）をＢａｍＨ１およびＮｃｏＩ（共にＮＥＢ由来）制限部位を用いて設計し、ｋａｒｐ菌株のＯ．ツツガムシより精製したＤＮＡを用いて、トランケートされた４７－ｋＤａのタンパク質をコードする遺伝子を増幅するためのＰ

ＣＲに使用した。ＰＣＲ産物（インサート）をＢａｍＨ１およびＮｃｏＩで消化したプラスミドｐＥＴ２４ｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ）にライゲートした。インサートの配列を確認し、ライゲートされたプラスミドをＢＬ２１（ＤＥ３）細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に形質転換した。ライゲートされたプラスミドを含むコロニーを、２ＹＴ培地上に生育させ、タンパク質の発現を３時間３７℃でＩＰＴＧの１ｍＭを用いて誘導した。この発現されたタンパク質を精製するために、６００ｍｌのＢ１２１（ＤＥ３）細胞を成育させ、誘導、遠心分離し、細胞ペレットを、Ｃｈｉｎｇら，Ｃｌｉｎ．Ｄｉａｇ．Ｌａｂ．Ｉｍｍｕｎｏ．５，５１９－５２６，１９８８により開発された方法に従って、５ｍＭ　ＥＤＴＡおよび１ｍＭ　ＰＭＳＦを含有する２０ｍＭトリス塩酸（ｐＨ８．０）で溶解した。超音波破壊および遠心分離の後、発現されたタンパク質は細胞封入体ではなくむしろ上澄みに主に会合していた。この分画を更に、３０，０００ＭＷカットオフのメンブレン、次いで、２０ｍＭ　トリスｐＨ８．０および２Ｍ　ＮａＣｌ塩勾配（Ａｇｉｌｅｎｔ　１１００　ＨＰＬＣ）を用いたＤＥＡＥ陰イオン交換により精製した。あるいは、タンパク質は２０ｍＭ　トリスｐＨ７．０および２Ｍ　ＮａＣｌ塩勾配を用いてＤＥＡＥ陰イオン交換により分離した。塩勾配と共に溶離するタンパク質を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、クマシーブルーで染色して各分画の純度を調べた。場合により、種々の分画を合わせてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に付した。

【００２７】

４７ｋ－Ｄａのタンパク質と他の既知タンパク質との配列の相同性は、標準的なＢＬＡＳＴ法により検索し、４７－ｋＤａのタンパク質の保存されたドメインの分析をＮＣＢＩのＣＤＤアルゴリズムを用いて行った。（図５～６）更に、４７－ｋＤａのタンパク質と同様のドメインを有するタンパク質を、共にアラインしてファミリー内の保存されたアミノ酸配列を分析した。

【００２８】

結果

４７－ｋＤａのタンパク質をコードするＤＮＡは、鋳型としてのＯ．ツツガムシｋａｒｐ菌株から精製したＤＮＡおよびこの遺伝子に特異的に設計されたプライマーを用いて良好にＰＣＲ増幅できた（図１）。このＰＣＲ産物のＰｅｔ２４ｄ（＋）プラスミドへのクローニングは、ＢａｍＨ１およびＮｃｏＩによる消化後に確認し（図１）、そしてＤＮＡ配列をＤＮＡシーケンサーで照合した。

【００２９】

４７－ｋＤａのタンパク質の発現は、３７℃における１ｍＭのＩＰＴＧ誘導の３時間後に観察された（図２）。この発現されたタンパク質の配列を、タンパク質シーケンサーで確認した。超音波処理および遠心分離の後、発現されたタンパク質は、Ｃｈｉｎｇらの報告したｒ５６タンパク質として封入体に会合しているよりはむしろ、主に初回遠心分離後の上澄みと会合していた（図２）。発現されたタンパク質は、膜分画と会合しており、界面活性剤（ＮＰ４０の１％）を添加することにより、精製操作中の収率が向上すると考えられる（データ示さず）。ｒ４７を含有する上澄みの一部を、まずｐＨ８．０のトリス緩衝液を用いたＨＰＬＣ上のＤＥＡＥ陰イオン交換により精製し、タンパク質をＮａＣｌ勾配（０．８ｍＭまで）で溶離し、分画を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した（図３）。上澄みの他の部分はｐＨ７．０のトリス緩衝液を用いたＨＰＬＣ上で精製し、ＮａＣｌ勾配（２Ｍまで）で溶離した。得られた分画をあわせ、ｒ４７について分析した（図４）。

【００３０】

標準的なＢＬＡＳＴを用いたｒ４７の同様性の検索によれば、種々のセリンプロテアーゼと相同であった（図５）。ｒ４７をＮＣＢＩにより保持されたタンパク質保存ドメインデータベースに対して検索したところ、トリプシン様（保存されたドメイン領域（２１７残基）の７７．７％をアラインした）およびＰＤＺドメイン（保存されたドメイン領域（８６残基）の７３．３％をアラインした）が確認された。これらの２種のドメインもまた、異なるセリンプロテアーゼと会合していた（図６）。

【００３１】

実施例２
４７ｋＤａツツガムシ病抗原と組み合わせたオリエンチア・ツツガムシ由来の組換え体５６ｋＤａタンパク質により誘導される相同防護の評価
感染に対するｒ５６およびｒ４７タンパク質の防護効果を評価するために、マウスにＫａｒｐ菌株由来の種々の用量のｒ５６およびｒ４７タンパク質成分を投与する。マウスにおいてｒ５６の２５μｇまたは２μｇによる免疫化が本発明者等の以前の実験（年次報告書Ｊ２＿００＿ＮＭＲＣ）において防護的な役割を示したため、本発明者等は本研究においてもｒ５６を試験するために同じ用量を用いる。ｒ４７タンパク質については、本発明者等は最適用量を知らないが、今回は５μｇおよび２５μｇの２種の用量から開始する。ミョウバンおよびＣｐＧをタンパク質：Ａｌ＋３：ＣｐＧ＝１：２５：１０の比率でアジュバントとして使用する。ミョウバンは、長期にわたりヒトにおける使用が許可されている。アルヒドロゲル上に吸着させた抗原により調製されたワクチンには、いくつかの利点がある。抗原含量が容易に標準化でき、ワクチンは良好な安定性を示す。アルヒドロゲル吸着抗原は、使用が簡素でより簡便である。更に、免疫化後の局所反応の程度が軽減される。ＣｐＧはＩＬ－１２およびＩＦＮ－ガンマにより占有されるサイトカインの生産のＴｈ１様パターンを誘導するが、Ｔｈ２サイトカインの分泌は殆ど無い。
【００３２】
４～５週齢、体重１３～１５グラムの雌性ＣＤ１マウスをＣｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ （Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）から購入する。各試験はマウス５～７群を用いる。信頼水準８０～８５％において防護的効力の２０％差を選択するためには最低１５～２０匹のマウスが必要である。２０匹のマウスの各群を５６ｋＤａ抗原のみ、または、ｒ４７抗原と組み合わせて、陰性対照群を除き、筋肉内で免疫化する。マウス１５匹を４週間後に免疫性のテストをし、５匹を屠殺して免疫性のテスト直前のＴ細胞免疫応答を測定する。
【００３３】
詳細な実験の設計：
試験１（５群）：
１．陰性対照：ＰＢＳのみ
２．ｒ５６のみ２５μｇ
３．４７ｋＤａのみ２５μｇ
試験２（７群）：
１．陰性対照：試験１の群１と同様
２．ｒ５６を２５μｇ＋４７ｋＤａを５μｇ
３．ｒ５６を２５μｇ＋４７ｋＤａを２５μｇ
試験３（５群）：
１．陰性対照：ＰＢＳのみ
２．ｒ５６のみ２μｇ
４．３．４７ｋＤａのみ４．２μｇ
試験４（７群）：
１．陰性対照：試験１の群１と同様
２．ｒ５６を２μｇ＋４７ｋＤａを５μｇ
３．ｒ５６を２μｇ＋４７ｋＤａを２μｇ
【００３４】
３）免疫応答のモニタリング：
（ａ）抗体の検出：マウス血清は免疫化の直前および免疫性のテストの前に採取する。各血清試料は、各抗原に対する抗体について酵素結合免疫吸着試験（ＥＬＩＳＡ）により二連で分析する。抗マウスＩｇＧおよびＩｇＭパーオキシダーゼで標識された抱合体（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ，ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を試験する。
【００３５】
（ｂ）血清中のサイトカインの検出：サイトカインは、炎症の間の免疫調節における役割

に着目して生理学的および病理学的に検討されている。ＩＦＮガンマおよびＩＬ－４は、それぞれＴｈ１およびＴｈ２細胞に対するサイトカインである。多くの細胞内感染について、ＩＬ－１２は、Ｔｈ１応答、即ち、ＩＦＮ－ガンマ生産を誘導する。ＩＦＮガンマおよびＩＬ－２のレベルは、５６ｋＤａ免疫化マウス由来の脾臓単核細胞において上昇した。上昇したＩＦＮはまた、オリエンチアで慢性的に感染されたマウスの脾臓細胞およびリンパ節細胞においても検出された。オリエンチアは、培養マウス細胞中のＩＮＦガンマに感受性であるとされている。ツツガムシ病感染患者の血清においては、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＩＦＮガンマ、および、ＴＮＦアルファのレベルが上向き調節（アップレギュレート）された。マウス血液は、免疫化前、免疫化後２、４、６、８、１０、１５および３０日にヘパリンリン中に採取する。血清試料は、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦアルファ、ＩＬ－４、ＩＬ－１２、Ｇ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦのサイトカイン濃度について二連で分析する。

【００３６】

（ｃ）抗原特異的Ｔ細胞によるサイトカインの生産：組換え体抗原で刺激した脾臓単核細胞（ＳＭＮＣ）を、刺激後第１日、第２日および第３日にＩＦＮガンマおよびＩＬ－２の生産についてモニタリングする。細胞をＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）密度勾配遠心分離により単離する。洗浄後、細胞を温ＲＰＭＩ－１０中ｍｌ当たり５×１０Ｅ６個の濃度で再懸濁し、上記したとおり９６穴プレートの各ウェル内に１００ｕｌを分注する。対応する組換え体抗原と共にインキュベートした後、培養上澄みを収集し、サイトカイン分析に用いる。三連のＳＭＮＣ培養物から得た上澄みをあわせ、全試料を三連で分析する。抗原刺激ＳＭＮＣ由来の上澄みのＩＬ－２活性は、抗ＩＬ－４抗体（１１Ｂ１１：１０μｇ／ｍｌ）の存在下のＩＬ－２依存性ＣＴＬＬ－２細胞の生育を支援するその能力について試験する。ＩＮＦ－ガンマおよびＩＬ－４に関し、レベルは酵素結合免疫吸着試験キット（Ｇｅｎｚｙｍｅ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ）により、製造元の取扱説明書に従って測定する。ＭＡＣＳ直接マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ　ＣＡ）を用いて、どの細胞がサイトカインを生産するかを調べるためにＣＤ４およびＣＤ８細胞を選択する。

【００３７】

（ｄ）脾臓細胞の増殖応答：ＳＭＮＣを上記したとおり調製する。種々の量の組換え体タンパク質またはオリエンチアＫａｒｐによる刺激の後、培養物を５％CO_2の湿潤雰囲気下で７２時間３７℃でインキュベートする。合計１ｕＣｉの［３Ｈ］チミジンを、別の１８時間の培養中、各ウェルに添加する。細胞をガラス繊維フィルターストリップ上に採集し、［３Ｈ］チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターで計数する。

【００３８】

予測的実施例３

免疫原性の組成物により免疫化された対象の免疫グロブリンを用いたウィルス負荷を軽減するためのＨＩＶ患者の治療に関する予測的実施例

現時点でＨＩＶ感染の動物モデルは存在しない。しかしながら、ヒトＣＤ－４遺伝子を保有するトランスジェニックマウスをＨＩＶに感染させることができる。この型のマウスを以下の実験において使用する。

【００３９】

マウスをＨＩＶに感染させる。２ヵ月後、マウスの１群は、前記免疫原性の組成物で免疫化した同型のマウスより得た超免疫血漿で治療する（群１）。もう１群のマウスは、正常血漿で治療して対照群とする（群２）。血液を両群より１週間間隔で４回採取する。血中のＨＩＶ負荷をリアルタイムＰＣＲにより定量する。群１の結果を群２の結果と比較することにより、超免疫血漿によって低下したウィルス負荷が示される。

【００４０】

結論

トランケートされた４７－ｋＤａタンパク質は、ＢＬ２１細胞において良好にクローニングされ過剰発現された。この過剰発現タンパク質は細胞封入体内には存在せず、精製操

作を複雑化した。界面活性剤の添加によりｒ４７の量が増大し、タンパク質が膜分画と会合していることが示唆された。２５，０００ＭＷカットオフの粗製抽出物の透析により、ある程度の精製が可能となり、陰イオン交換カラム上のｐＨ８．０またはｐＨ７．０の緩衝液と塩勾配を用いたその後の精製により、更に精製が可能となったが、タンパク質はなお完全には精製されなかった。ｒ４７のｐＩは８．２であると推定され、陽イオン交換が精製にはより適当であることが示唆された。実験を継続して陽イオン交換によるｒ４７の精製と、その後のゲル濾過を行うことにより所望の純度を達成する。

【００４１】

【化１】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID No. 1: Truncated Protein Sequence of r47 Protein
Expressed, truncated protein sequence (translated from 184-1458 of DNA sequence, bolded sequence was confirmed by N-terminal protein sequencing)

MVNSLSDIVEPLISTVVSIYAVDTNIGISFNNKVSKYQQEVFLGSGVIIDSSGYIVTNENVIA
GAENIKVKLHDGSELIAELVGSDNKINIALLKINSPAALSYATFGDSNQSRVGDQVIAIGSPF
GLRGTVTNGIISSKGPDMGNGIVTDFIQTNAAIHMGSFGGPMFNLEGKIIGINSIHVSYSGISF
AIPSNTVLEAVECLKKGEKIRRGMLNVMLNELTPELNENLGLKQDQNGVLITEVIKEGSAA
QCGIAPGDVITKFHDKEIKTGRDLQVAVSSTMLNSEREVELLRNGKSMTLKCKIIANKGEDS
EQQSNDQSLVVNGVKFVDLTPDLVKKYNITSANNNGLFVLEVSPNSSWGRYGLKMGLRPR
DIILSVKRDDNKKDISVKTLREIVTNIKHNEIFFTV QRGDRMLYIALPNINK

Protein sequence data output (only N-terminal):

MVNSLSDIVEPLISTVV

【００４２】

【化２】

SEQ ID No. 2: r56 Protein Karp (Ching)
The confirmed sequence for r56 by Ching (amino acid 80-456). The corrected sequence is highlighted and underlined

MTIAPGFRAEIGVMYLTNITAQVEEGKVKADSVGETKADSVGGK
DAPIRKRFKLTPPQPTIMPISIAVRDFGIDIPN**IPQQQAQAAQPQ**LNDE
QRAAARIAWLKNCAGIDYRVKNPNDPNGPMVINPILLNIPQGNP
NPVGNPPQRANPPAGFAIHNHEQWRHLVVGLAALSNANKPSASP
VKVLSDKITQIYSDIKHLADIAGIDVPDTSLPNSASVEQIQNKMQ
ELNDLLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLNFVMPQQAQQQGQGQ
QQQAQATAQEAVAAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIK
KAMEKLAAQQEEDAKNQGEGDCKQQQGTSEKSKKGKDKEAEFD
LSMIVGQVKLYADVMITESVSI

PI = 5.8,
MW 40903, 377 a.a.
Extinction coefficient A_{280}=0.754 (1 mg/ml)

【００４３】
【化３】

SEQ ID No. 3: r56 Protein Sequence (Kato)
>Kato sequence number 21 529 aa
MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGDEGG LECGPYAKVG VVGGMITGVE STRLDPADAG GKKQLPLTTS
MPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLANVK AEVESGKTGS DADIRSGADS PMPQRYKLTP PQPTIMPISI**
ADRDLGVDIP NVPQGGANHL GDNLGANDIR RADDRITWLK NYAGVDYMVP DPNNPQARIV NPVLLNIPQG
PPNANPRQAM QPCSILNHDH WRHLVVGITA MSNANKPSVS PIKVLSEKIV QIYRDVKPFA RVAGIEVPSD
PLPNSASVEQ IQNKMQELND ILDEIRDSFD GCIGGNAFAN QIQLNFRIPQ AQQQGQGQQQ QQAQATAQEA
AAAAAVRVLN NNDQIIKLYK DLVKLKRHAG IKKAMEELAA QDGGCNGGGD NKKKRGASED SDAGGASKGG
KGKETKETEF DLSMIVGQVK LYADLFTTES FSIYAGLGAG LAYTSGKIDG VDIKANTGMV ASGALGVAIN
AAEGVYVDIE GSYMHSFSKI EEKYSINPLM ASFGVRYNF

【００４４】
【化４】

SEQ ID No. 4: r56 Protein (Gilliam)
>Gilliam sequence number 25 524 aa
MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGEEGG LECGPYGKVG IVGGMITGAE STRLDSTDSE GKKHLSLTTG
LPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLRNIS AEVEVGKGKV DSKGEIKADS GGGTDTPIRK RFKLTPPQPT**
IMPISIADRD VGVDTDILAQ AAAGQPQLTV EQRAADRIAW LKNYAGIDYM VPDPQNPNAR VINPVLLNIT
QGPPNVQPRP RQNLDILDHG QWRHLVVGVT ALSHANKPSV TPVKVLSDKI TKIYSDIKPF ADIAGIDVPD
TGLPNSASVE QIQSKMQELN DVLEDLRDSF DGYMGNAFAN QIQLNFVMPQ QAQQQQGQGQ QQQAQATAQE
AVAAAAVRLL NGNDQIAQLY KDLVKLQRHA GVKKAMEKLA AQQEEDAKNQ GEGDCKQQQG ASEKSKEGKG
KETEFDLSMI VGQVKLYADL FTTESFSIYA GVGAGLAHTY GKIDDKDIKG HTGMVASGAL GVAINAAEGV
YVDLEGSYMH SFSKIEEKYS INPLMASVGV RYNF

【００４５】

【化５】

Primer sets

a. Forward primers:

Gene (125-174 as target gene sequence)

5'-tatgcat aCCATGGtaa atagtttatc tgat-3' (SEQ ID No. 5)
Nco I site

b. Reverse Primers:

Gene sequence of 1443-1477 as target, 35 bp
5'-cgcctGGATCC tagatttacttattaatattaggt-3'
BamH1 site

(SEQ ID No. 6)

【００４６】

【化６】

SEQ ID NO. 7: PCR amplified sequence: 174-1481 nt. Expressed DNA sequence:184-1458 nt, aa 42-466. the coding region is bold.

174 tatgcat
181 att **atg gtaa atagtttatc tgatatagtt gagccattaa tatctacagt agtaagtatt**
241 tatgctgtag atactaacat tggtattagt tttaataata aggtatctaa gtatcagcaa
301 gaagtgttct taggttctgg ggttatcatt gatagttctg ggtatattgt tactaatgag
361 aatgttatag caggagctga aaatataaaa gtaaagttgc atgatggttc agaactcata
421 gcagaattag ttggtagtga caataaaatt aatatagctt tattaaaaat taattctcca
481 gcagcattat cttatgcgac ttttggcgac tcaaatcagt ctagagtagg agatcaggtt
541 attgcaatag gaagtccttt tggtttaaga ggaacagtaa caaatggcat tatttcttct
601 aaaggaccag atatgggtaa cggcatagta actgatttta ttcaaactaa tgctgctatt
661 catatgggta gctttggtgg accgatgttt aatcttgaag gaaaaattat tggaattaat
721 tccattcacg tatcttactc aggcataagt tttgctattc catctaatac tgtacttgaa
781 gcagttgaat gcttaaaaaa aggagaaaaa attcgtcgtg gtatgttaaa tgttatgctt
841 aatgaattaa ctccagaatt aaatgagaat ttaggactta aacaagatca aaatggagtt
901 ctaataactg aagttataaa agaaggatct gcagcacaat gtggaattgc tcctggagat
961 gtaattacta aatttcatga taaagagatc aaaacaggga gagatttaca ggtagctgta
1021 tcttcaacta tgcttaattc tgaaagagaa gttgagcttt tacgtaatgg taagtcgatg
1081 actctaaaat gtaaaattat tgccaacaaa ggtgaggata gtgagcaaca aagtaatgat
1141 caaagccttg tggttaatgg tgtaaaattt gttgatctta cacctgattt agtgaagaaa
1201 tataatatta cttcagctaa taataatggg ttatttgtcc ttgaagtttc gcctaactct
1261 tcttggggga gatatggttt aaaaatgggg ctaagaccta gagatataat tttatcagtt
1321 aaacgtgatg ataataaaaa agatatttct gttaaaactc taagagaaat agtgacaaat
1381 ataaagcata atgaaatttt ctttacagtg caaagaggag atagaatgct ttacattgct
1441 ttacctaata ttaataag ta aatctagttt aaaggcgatt t

本発明の要件を記載したが、これは多様な変更が可能であることは明らかである。このような変更は本発明の要件の精神と範囲を外れるものではなく、このような改変の全ては添付する請求項の範囲に入るものとする。

【図面の簡単な説明】

【００４７】

【図１】図１は、トランケートされた４７ｋＤａのタンパク質をコードするＤＮＡのＰＣＲ産物および消化されたプラスミドを示すＳＤＳ－ＰＡＧＥである。

【図２】図２は、ＩＰＴＧによるｒ４７タンパク質の誘導および粗製抽出物からのｒ４７の分画を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥである。

【図３】図３は、ＤＥＡＥ陰イオン交換カラム（ｐＨ８．０）上のｒ４７タンパク質の分画を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥである。

【図４】図４は、ＤＥＡＥ陰イオン交換カラム（ｐＨ７．０）上のｒ４７タンパク質の分画を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥである。

【図５】図５は、ｒ４７タンパク質配列のブラスト検索である。

【図６】図６は、ｒ４７およびセリンプロテアーゼの間で保存されたドメインを比較するチャートである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID No. 1: Truncated Protein Sequence of r47 Protein
Expressed, truncated protein sequence (translated from 184-1458 of DNA sequence, bolded sequence was confirmed by N-terminal protein sequencing)

MVNSLSDIVEPLISTVVSIYAVDTNIGISFNNKVSKYQQEVFLGSGVIIDSSGYIVTNENVIA
GAENIKVKLHDGSELIAELVGSDNKINIALLKINSPAALSYATFGDSNQSRVGDQVIAIGSPF
GLRGTVTNGIISSKGPDMGNGIVTDFIQTNAAIHMGSFGGPMFNLEGKIIGINSIHVSYSGISF
AIPSNTVLEAVECLKKGEKIRRGMLNVMLNELTPELNENLGLKQDQNGVLITEVIKEGSAA
QCGIAPGDVITKFHDKEIKTGRDLQVAVSSTMLNSEREVELLRNGKSMTLKCKIIANKGEDS
EQQSNDQSLVVNGVKFVDLTPDLVKKYNITSANNNGLFVLEVSPNSSWGRYGLKMGLRPR
DIILSVKRDDNKKDISVKTLREIVTNIKHNEIFFTV QRGDRMLYIALPNINK

Protein sequence data output (only N-terminal):

MVNSLSDIVEPLISTVV

SEQ ID No. 2: r56 Protein Karp (Ching)
The confirmed sequence for r56 by Ching (amino acid 80-456). The corrected sequence is highlighted and underlined

MTIAPGFRAEIGVMYLTNITAQVEEGKVKADSVGETKADSVGGK
DAPIRKRFKLTPPQPTIMPISIAVRDFGIDIPN**IPQQQAQAAQPQ**LNDE
QRAAARIAWLKNCAGIDYRVKNPNDPNGPMVINPILLNIPQGNP
NPVGNPPQRANPPAGFAIHNHEQWRHLVVGLAALSNANKPSASP
VKVLSDKITQIYSDIKHLADIAGIDVPDTSLPNSASVEQIQNKMQ
ELNDLLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLNFVMPQQAQQQGQGQ
QQQAQATAQEAVAAAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIK
KAMEKLAAQQEEDAKNQGEGDCKQQQGTSEKSKKGKDKEAEFD
LSMIVGQVKLYADVMITESVSI

PI = 5.8,
MW 40903, 377 a.a.
Extinction coefficient A_{280}=0.754 (1 mg/ml)

SEQ ID No. 3: r56 Protein Sequence (Kato)

>Kato sequence number 21 529 aa

MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGDEGG LECGPYAKVG VVGGMITGVE STRLDPADAG
GKKQLPLTTS
MPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLANVK AEVESGKTGS DADIRSGADS PMPQRYKLTP**
PQPTIMPISI
ADRDLGVDIP NVPQGGANHL GDNLGANDIR RADDRITWLK NYAGVDYMVP DPNNPQARIV
NPVLLNIPQG
PPNANPRQAM QPCSILNHDH WRHLVVGITA MSNANKPSVS PIKVLSEKIV QIYRDVKPFA
RVAGIEVPSD
PLPNSASVEQ IQNKMQELND ILDEIRDSFD GCIGGNAFAN QIQLNFRIPQ AQQQGQGQQQ
QQAQATAQEA
AAAAAVRVLN NNDQIIKLYK DLVKLKRHAG IKKAMEELAA QDGGCNGGGD NKKKRGASED
SDAGGASKGG
KGKETKETEF DLSMIVGQVK LYADLFTTES FSIYAGLGAG LAYTSGKIDG VDIKANTGMV
ASGALGVAIN
AAEGVYVDIE GSYMHSFSKI EEKYSINPLM ASFGVRYNF

SEQ ID No. 4: r56 Protein (Gilliam)

>Gilliam sequence number 25 524 aa

MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGEEGG LECGPYGKVG IVGGMITGAE STRLDSTDSE
GKKHLSLTTG
LPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLRNIS AEVEVGKGKV DSKGEIKADS GGGTDTPIRK**
RFKLTPPQPT
IMPISIADRD VGVDTDILAQ AAAGQPQLTV EQRAADRIAW LKNYAGIDYM VPDPQNPNAR
VINPVLLNIT
QGPPNVQPRP RQNLDILDHG QWRHLVVGVT ALSHANKPSV TPVKVLSDKI TKIYSDIKPF
ADIAGIDVPD
TGLPNSASVE QIQSKMQELN DVLEDLRDSF DGYMGNAFAN QIQLNFVMPQ QAQQQQGQGQ
QQQAQATAQE
AVAAAAVRLL NGNDQIAQLY KDLVKLQRHA GVKKAMEKLA AQQEEDAKNQ GEGDCKQQQG
ASEKSKEGKG
KETEFDLSMI VGQVKLYADL FTTESFSIYA GVGAGLAHTY GKIDDKDIKG HTGMVASGAL
GVAINAAEGV
YVDLEGSYMH SFSKIEEKYS INPLMASVGV RYNF

Primer sets

a. Forward primers:

Gene (125-174 as target gene sequence)

5'-tatgcat aCCATGGtaa atagtttatc tgat-3' (SEQ ID No. 5)
Nco I site

b. Reverse Primers:

Gene sequence of 1443-1477 as target, 35 bp

5'-cgcctGGATCC tagatttacttattaatattaggt-3'
BamH1 site

(SEQ ID No. 6)

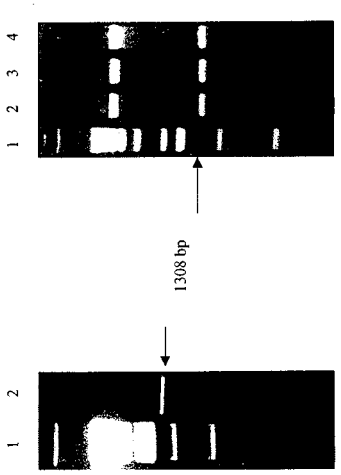
SEQ ID NO. 7: PCR amplified sequence: 174-1481 nt. Expressed DNA sequence:184-1458 nt, aa 42-466. the coding region is bold.

174 tatgcat
181 att **atg gtaa atagtttatc tgatatagtt gagccattaa tatctacagt agtaagtatt**
241 **tatgctgtag atactaacat tggtattagt tttaataata aggtatctaa gtatcagcaa**
301 **gaagtgttct taggttctgg ggttatcatt gatagttctg ggtatattgt tactaatgag**
361 **aatgttatag caggagctga aaatataaaa gtaaagttgc atgatggttc agaactcata**
421 **gcagaattag ttggtagtga caataaaatt aatatagctt tattaaaaat taattctcca**
481 **gcagcattat cttatgcgac ttttggcgac tcaaatcagt ctagagtagg agatcaggtt**
541 **attgcaatag gaagtccttt tggtttaaga ggaacagtaa caaatggcat tatttcttct**
601 **aaaggaccag atatgggtaa cggcatagta actgatttta ttcaaactaa tgctgctatt**
661 **catatgggta gctttggtgg accgatgttt aatcttgaag gaaaaattat tggaattaat**
721 **tccattcacg tatcttactc aggcataagt tttgctattc catctaatac tgtacttgaa**
781 **gcagttgaat gcttaaaaaa aggagaaaaa attcgtcgtg gtatgttaaa tgttatgctt**
841 **aatgaattaa ctccagaatt aaatgagaat ttaggactta aacaagatca aaatggagtt**
901 **ctaataactg aagttataaa agaaggatct gcagcacaat gtggaattgc tcctggagat**
961 **gtaattacta aatttcatga taaagagatc aaaacaggga gagatttaca ggtagctgta**
1021 **tcttcaacta tgcttaattc tgaaagagaa gttgagcttt tacgtaatgg taagtcgatg**
1081 **actctaaaat gtaaaattat tgccaacaaa ggtgaggata gtgagcaaca aagtaatgat**
1141 **caaagccttg tggttaatgg tgtaaaattt gttgatctta cacctgattt agtgaagaaa**
1201 **tataatatta cttcagctaa taataatggg ttatttgtcc ttgaagtttc gcctaactct**
1261 **tcttggggga gatatggttt aaaaatgggg ctaagaccta gagatataat tttatcagtt**
1321 **aaacgtgatg ataataaaaa agatatttct gttaaaactc taagagaaat agtgacaaat**
1381 **ataaagcata atgaaatttt ctttacagtg caaagaggag atagaatgct ttacattgct**
1441 **ttacctaata ttaataag** ta aatctagttt aaaggcgatt t

【図１】

Figure 1

47-kDaの蛋白をコードするDNAのPCR産物および消化されたプラスミド

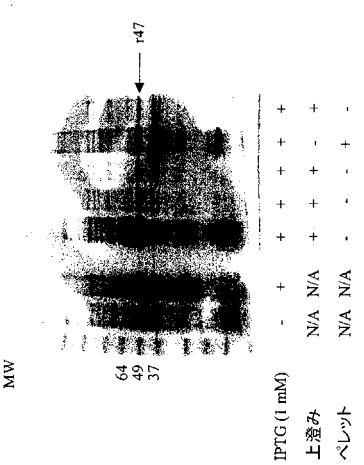


レーン1：1kbDNAマーカー　　レーン1：1kbDNAマーカー
レーン2：PCR産物　　レーン2～4：正確なインサートを含む個々のコロニー

【図２】

Figure 2

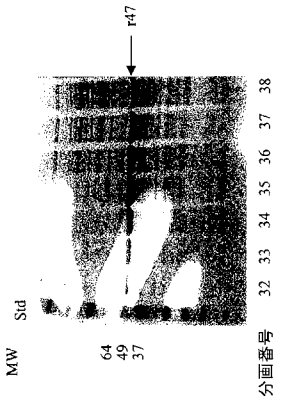
IPTGによるr47蛋白の誘導および粗製抽出液からのr47の分画化



【図３】

Figure 3

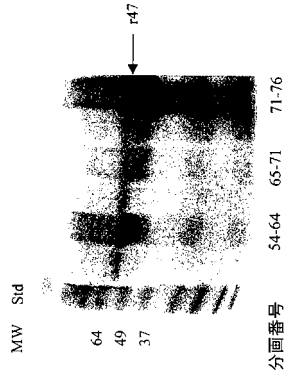
DEAE陰イオン交換カラム（pH8.0）上のr47蛋白の分画化



【図４】

Figure 4

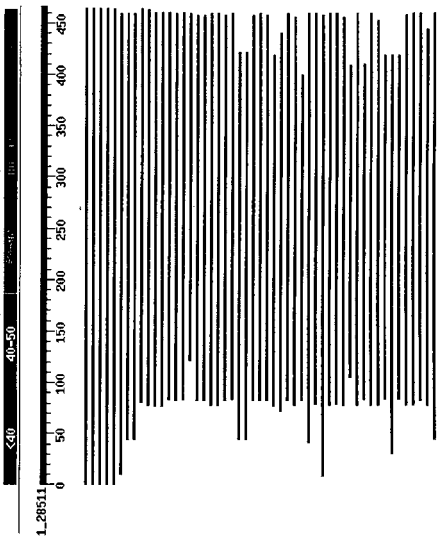
DEAE陰イオン交換カラム（pH7.0）上のr47蛋白の分画化



【図５】

Figure 5

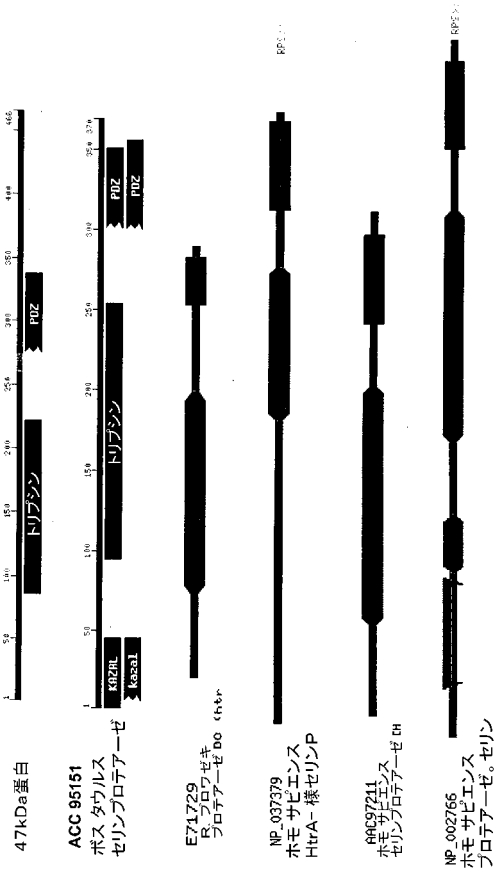
r47蛋白配列のBLAST検索



【図６】

Figure 6

r47およびセリンプロテアーゼの間の保存されたドメインの比較



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/15072

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 39/00, 39/02, 39/40; C07K 16/12
US CL : 424/ 184.1, 234.1; 530/388.2, 388.4
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 424/ 184.1, 234.1; 530, 300, 350; 530/388.2, 388.4; 435/4, 7.1, 7.2, 7.32, 7.22, 7.9, 7.92, 7.93,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST, PubMed, Medline , CAPLUS, CABA, PASCAL, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHING et al., Identification of Human Antibody Epitopes on the 47 kDa, 56 kDa, and 22 kDa Protein Antigens of Orientia tsutsugamushi with Synthetic Peptides, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, Volume 55, page 300, abstract 608.	1, 6, 7, 12, 13
Y --- A	CHING et al., Expression and Refolding of Truncated Recombinant Major Outer Membrane Protein ANtigen (r56) of Orientia tsutsugamushi and Its Use in Enzyme-Liked immunosorbent Assays, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 1998, Vol 5 No 4, pages 519-26.	1, 6, 7, 12, 13, 18 --- 22
Y	HICKMAN et al., Murine T-cell Response to Native and Recombinant Protein Antigens of Rickettsia tsutugamushi, Infection and Immunity, May 1993, Vol 61, No 5, pages	1, 6, 7
Y	CHING et al. Early Diagnosis of Scrub Typhus with a Rapid Flow Assay Using Recombinant Major Outer Membrane Protein Antigen (r56) of orientia tsutugamushi, Clinical and Laboratory Immunology, Mar 2001, Vol 8, No 2, pages 409-14.	1, 6, 7, 12, 13, 18
Y	SEONG et al., Neutralization Epitopes on the Antigenic Domain II of the Orientia tsutugamuchi 56-kDa Protein Revealed by Monolconal Antibodies, Vaccine, 2001, Vol 19, pages 2-9.	1, 6, 7, 12, 13, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 April 2004 (14.04.2004)

Date of mailing of the international search report
20 JUL 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Zachariah Lucas
Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US03/15072

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OAKS et al., Antigenic and Genetic Relatedness of Eight Rickettsia tsutugamushi Antignes, Infection and Immunity, October 1989, Vol 57, No 10, pages 3116-22.	1, 6, 7, 12, 13, 18
A	WATT et al., HIV-1 Suppression During Acute Scrub-Typhus Infection, The Lancet, August 2000, Volume 356, pages 475-79.	18, 22
A	WATT et al., Passive Transfer of Scrub Typhus Plasma to Patients with AIDS: a Descriptive Clinical Study, Quarterly Journal of Medicine, 2001, Vol 94, pages 599-607.	18, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/15072

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claim Nos.: 2-5,8-11,14-17,19-21 and 23-25
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/15072

Continuation of Box I Reason 2:
These claims read on inventions relating to specific protein sequences. However, no computer readable form of the indicated sequences was provides, such that no meaningful search could be made of the claimed inventions of these claims.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
// Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ゲ、 ホン
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２０８９８ ゲイザーズバーグ グレイ コルト ドライブ １３９００
(72)発明者 チャオ、 チエン－チュン
アメリカ合衆国 エム エヌ. ベゼスダ ストーンヘッジ プレイス ６１３１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA13 AA15 BA31 BA35 CA02 CA05 CA09 HA11
4C085 AA03 AA14 BA15 BA47 BB11 CC07 DD23 DD62 EE01 GG04
4H045 AA10 AA11 AA30 CA11 DA50 DA89 EA31 EA52 FA74